

Vesna Vujeva

Ispitivanje stabilnosti glutaciona u uzorcima plazme i krvi

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2019.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Stanična biologija s genetikom Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za Farmaceutsku botaniku pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Ane-Marije Domijan i suvoditeljstvom dr. sc. Marka Gerića, znanstvenog suradnika u Jedinici za mutagenezu Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu.

*Zahvaljujem svojim mentorima, prof. dr. sc. Ana-Mariji Domijan i dr. sc. Marku Geriću, na strpljenju, stručnom vodstvu i pomoći tijekom izrade diplomskog rada.
Posebno se zahvaljujem svojoj majci Živani, tetki Luci, baki Ljubi prijateljima Vlasti, Vedranu i Ivanu na bezgraničnoj podršci, pomoći i razumijevanju tijekom studija.*

Sadržaj:

1. Uvod	1
1.1. Slobodni radikali	2
1.1.1. Reaktivni kisikovi spojevi	2
1.2. Oksidacijski stres i stanični mehanizam obrane od oksidacijskog stresa	3
1.2.1. Glutation	4
1.3. UV-Vis spektrofotometrija	5
1.3.1. Određivanje koncentracije iz očitane apsorbancije	6
2. Obrazloženje teme	7
3. Materijali i metode	9
3.1. Materijali	10
3.1.1. Kemikalije	10
3.1.2. Oprema	10
3.2.1. Princip metode određivanja GSH	10
3.2.2. Priprema otopina	11
3.2.3. Postupak pripreme uzorka plazme i krvi za određivanja koncentracije GSH	12
3.3. Biološki pokus za utvrđivanje stabilnosti GSH u uzorku plazme i krvi	13
3.4. Statistička obrada rezultata	14
4. Rezultati i rasprava	15
4.1. Optimiziranje metode mjerenja GSH u plazmi	16
4.2. Stabilnost produkta TNB	18
4.3. Ispitivanje stabilnosti GSH u uzorcima plazme i krvi u ovisnosti o pohranjivanju	19
5. Zaključci	22
6. Literatura	24
7. Sažetak/Summary	28
8. Prilog	31

1. Uvod

1.1. Slobodni radikali

Slobodni radikali predstavljaju atome ili molekule koji u svojoj vanjskoj ljusci imaju jedan ili više nesparenih elektrona (Halliwell i Gutteridge, 2007). Zbog slobodnog elektrona ili više njih, slobodni radikal se u biološkom sustavu smatra nestabilnom molekulom s niskom specifičnošću za reaktante. Slobodni radikali se u kemijskoj reakciji oksidacije brzo i nepredvidivo spajaju s bilo kojom, prostorno bliskom molekulom proteina, lipida, ugljikohidrata ili nukleinske kiseline (Reuben, 1998). Oni nastoje popuniti valentnu orbitalu te spariti nespareni elektron, odnosno elektrone i time postignuti stabilnu elektronsku konfiguraciju. Pri tome mogu nastati novi radikali s mogućnošću pokretanja novoga niza neenzimskih lančanih reakcija.

1.1.1. Reaktivni kisikovi spojevi

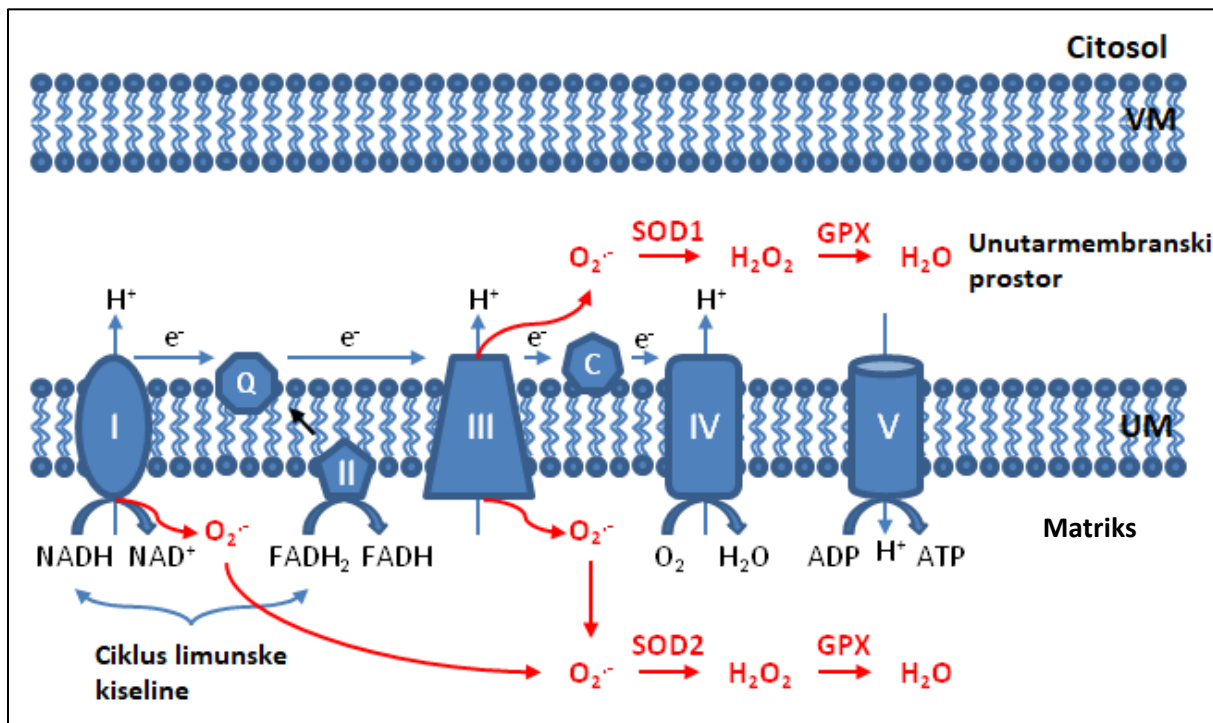
Reaktivni kisikovi spojevi (engl. *reactive oxygen species* - ROS) djelomično su reducirani i izrazito reaktivni metaboliti kisika koji nastaju uslijed prijenosa elektrona na molekulu kisika. ROS-ovi mogu biti slobodni radikali, ali i reaktivni intermedijeri kisika. U skupinu ROS-ova koji su slobodni radikali (Tablica 1) pripadaju superoksid radikal ($O_2^{\bullet-}$) hidroksil radikal (HO^{\bullet}), peroksilni (RO_2^{\bullet}) i alkoksilni radikal (RO^{\bullet}). Reaktivni intermedijeri kisika su spojevi koji nisu slobodni radikali sami po sebi, ali mogu pokrenuti reakcije kojima nastaju slobodni radikali. To su primjerice vodikov peroksid (H_2O_2), hipoklorna kiselina ($HOCl$), reaktivni (singletni) kisik ($^1\Delta gO_2$) te okolišni i endogeni ozon (O_3). HO^{\bullet} je posebno reaktivan radikal i smatra se izravno odgovornim za oksidacijska oštećenja u biološkim sustavima (Halliwell i Cross, 1994; Fleury i sur., 2002).

Tablica 1. Vrste reaktivnih kisikovih spojeva (ROS-ova).

Radikali		Reaktivni intermedijeri	
Superoksid radikal	$O_2^{\bullet-}$	Vodikov peroksid	H_2O_2
Hidroksil radikal	HO^{\bullet}	Hipoklorasta kiselina	$HOCl$
Peroksil radikal	RO_2^{\bullet}	Hipobromasta kiselina	$HOBr$
Alkoksil radikal	RO^{\bullet}	Ozon	O_3
Hidroperoksil radikal	HO_2^{\bullet}	Singletni kisik	$^1\Delta gO_2$

Primjer staničnog organela u kojem nastaju endogeni ROS-ovi je mitohondrij. U mitohondriju endogeni ROS-ovi nastaju procesom oksidativne fosforilacije koja se odvija na unutrašnjoj membrani mitohondrija. Tijekom prijenosa elektrona preko kompleksa membranskih proteina u oksidacijsko-redukcijskim reakcijama može doći do prijevremenog

„curenja“ elektrona s transportnog lanca na kisik i nastanka superoksidnog radikala, $O_2^{\cdot-}$ (Slika 1). Ovo se događa u svega 3 - 5 % slučajeva i to najčešće na razini kompleksa 1 (NADH dehidrogenaza) i 3 (citokrom b-c1 kompleks) (Smith i sur., 2004; Halliwell i Gutteridge, 2007).



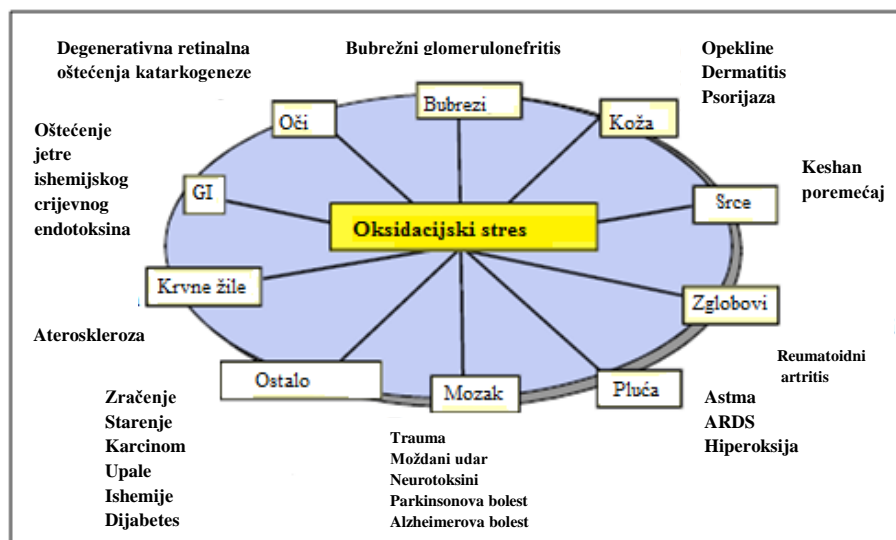
Slika 1. Prijenos elektrona u procesu oksidativne fosforilacije te proces stvaranja i uklanjanja kisikovih radikala (preuzeto od: Li i sur., 2013).

1.2. Oksidacijski stres i stanični mehanizam obrane od oksidacijskog stresa

Oksidacijski stres označava pomak ravnoteže u staničnim oksidacijsko-redukcijskim reakcijama prema oksidaciji ili prekomjernom stvaranju radikala. Tijekom normalnog staničnog metabolizma stvaraju se slobodni radikali, no sustav obrane odgovarajuće reagira s nastalim slobodnim radikalima te se tako održava homeostaza. Ukoliko je broj citoprotektivnih enzima i antioksidansa nedostatan, nastupa oksidacijski stres. Oksidacijski stres može dovesti do poremećaja staničnog metabolizma, uključujući lomove lanaca molekule DNA, povećanje unutarstaničnog slobodnog kalcija, oštećenje membranskih ionskih transportera i proteina te peroksidaciju lipida (Čvorišćec i Čepelak, 2009). Uočena je uloga oksidacijskog stresa u mnogim bolestima (Slika 2).

Antioksidansi pripadaju grupi spojeva koja imaju funkciju sprečavanja nastanka oksidacijskog stresa. Djeluju tako što mogu sniziti količinu slobodnih radikala i/ili zaustaviti lančane reakcije koje su pokrenuli slobodni radikali. Osim toga njihova uloga je popravak

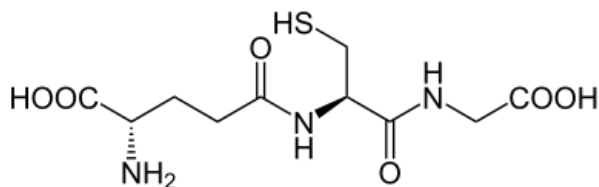
oštećenja nastalih oksidacijom staničnih makromolekula. Neki od poznatijih antioksidansa, a koji sprečavaju nastajanje slobodnih radikala, su vitamini i neki flavonoidi (Reuben, 1998).



Slika 2. Bolesti u kojima je uočen utjecaj oksidacijskog stresa (preuzeto od: Adly, 2010).

1.2.1. Glutation

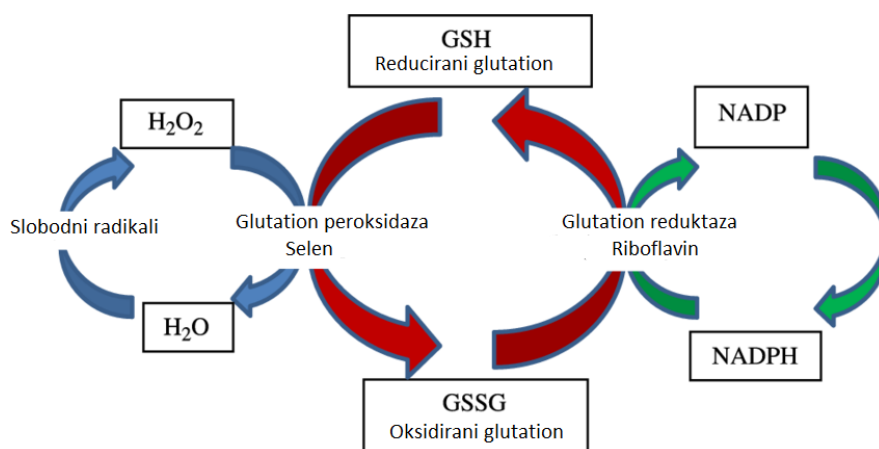
Glutation (GSH, Slika 3) je otkriven 1935. godine (Jurković i sur., 2008). Strukturno je neproteinski tiol, tripeptid koji se biosintetizira iz aminokiselina L-cistein, L-glutaminske kiseline i glicina. GSH je prisutan u svim stanicama te ima brojne uloge u stanici. Kao kofaktor sudjeluje u brojnim enzimatskim reakcijama u citoplazmi stanice. Također ima ulogu u posttranslacijskim modifikacijama. U biljkama predstavlja glavni spremišni i transportni oblik neproteinskog reduciranog sumpora te služi kao multifunkcionalni metabolit (Noctor i sur., 2002). U stanicama sisavaca GSH je prisutan u visokoj koncentraciji (oko 5 mM) i kao sulfhidrilni pufer štiti stanice tako što reagira s H_2O_2 i ostalim štetnim produktima koji nastaju aerobnim metabolizmom te sprečava oksidacijski stres (Berg i sur., 2014).



Slika 3. Kemijska struktura reduciranog glutathiona (GSH).

Glutation zbog izmjene elektrona u prisutnosti slobodnih radikala prelazi između reduciranog tiolnog oblika (GSH) i oksidiranog oblika (GSSG) u kojem su dva tripeptida povezana disulfidnim mostom (Berg i sur., 2014). GSSG se reducira pomoću glutathion reduktaze u GSH (Slika 4). Izvor elektrona je NADPH. U većini sisavaca omjer GSH prema

GSSG obično je 500 puta veći, odnosno reduciranog GSH ima i do 500 puta više nego oksidiranog GSSG. Omjer reduciranog i oksidiranog glutathiona predstavlja jačinu oksidacijskog stresa u organizmu (Berg i sur., 2014).



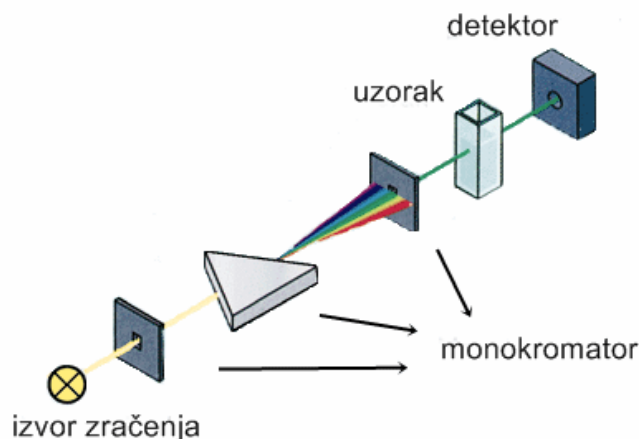
Slika 4. Oksidacija GSH u GSSH u stanici (preuzeto od: Patel i sur., 2014).

1.3. UV-Vis spektrofotometrija

UV-Vis spektrofotometar je uređaj za analizu spektra elektromagnetskoga zračenja. Sadrži optički sustav za stvaranje monokromatskog svjetla valne duljine od 190 do 800 nm i odgovarajući detektor za mjerenje apsorbancije. Ispravnost instrumenta se ispituje kalibracijom skale valnih duljina i apsorbancije. Prednosti ove metode su jednostavnost, izdržljivost, preciznost i dostupnost. Njeni nedostaci su nedovoljna selektivnost pogotovo u slučaju analize tvari koje imaju kromofore te slaba primjenjivost u analizi smjesa (Nigović i sur., 2007).

Osnovni dijelovi UV-Vis spektrofotometra su:

- 1. izvor zračenja** (deuterijeva lampa za ultraljubičasto područje i živina odnosno volframova lampa za vidljivo područje);
- 2. monokromator** (optički instrument za izdvajanje zračenja sasvim uskoga područja spektra, tj. za dobivanje tzv. monokromatske (jednobojne) svjetlosti (<http://www.enciklopedija.hr/>), može biti prizma ili rešetka s ulaznom i izlaznom pukotinom);
- 3. nosač uzorka** (najčešće kiveta, u UV području treba biti od kvarcnog stakla da bi svjetlosti val nesmetano dolazio do uzorka);
- 4. detektor zračenja** (Watson, 1990). Osnovni dijelovi UV-Vis spektrofotometra prikazani su Slikom 5.



Slika 5. Osnovni dijelovi UV-Vis spektrofotometra (preuzeto od: Gohain, 2008).

1.3.1. Određivanje koncentracije iz očitane apsorbancije

UV-Vis spektrofotometar funkcionira tako da mjeri apsorpciju zračenja molekule u otopini koja je definirana Beer-Lambertovim zakonom. Mjera količine svjetla koju apsorbira uzorak je apsorbancija. Definirana je kao dekadski logaritam recipročne vrijednosti transmisije (T) monokromatskog svjetla i prikazuje se izrazom:

$$A = \log_{10} \frac{I_0}{I} = \epsilon lc$$

pri čemu I_0 predstavlja intenzitet ulaznog monokromatskog svjetla, a I intenzitet izlaznog monokromatskog svjetla. $I < I_0$ ukazuje na to da je uzorak apsorbirao dio svjetla. Molarni apsorpcijski (ekstinkcijski) koeficijent (ϵ , mjerna jedinica je $L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) je konstantan za određeni spoj i valnu duljinu pri kojoj se mjeri, l je širina kivete i izražava se u cm, a koncentracija (c) u mol/L (Nigović i sur., 2007).

2. Obrazloženje teme

Posljednjih 20-tak godina velika pozornost istraživača usmjerena je na istraživanje oksidacijskog stresa i ROS-ova koji ga uzrokuju. Istražuje se razina oksidacijskog stresa, ali i razlike u antioksidacijskim mehanizmima između osoba, posebice kod bolesnika koji boluju od bolesti koje se povezuju sa starenjem poput karcinoma, artritisa i ateroskleroze. Rezultati tih istraživanja pokazuju da se oksidacijski stres i smanjena aktivnost antioksidacijske obrane organizma može povezati s nastankom raznih bolesti (Slika 2) (Adly, 2010; Gerić i sur., 2016; Milevoj Kopčinović i sur., 2016; Rogulj i sur., 2012).

Antioksidacijska zaštita je važna u uklanjanju slobodnih radikala koji dovode do oksidacijskog stresa. Najučinkovitiji antioksidansi enzimskog karaktera su superoksid dismutaza, katalaza i glutation peroksidaza. Najdjelotvorniji neenzimski antioksidansi su uglavnom tiolni antioksidansi kao na primjer GSH, tioredoksin i lipoična kiselina (Jurković i sur., 2008). GSH je prisutan u svim eukariotskim stanicama i uključen je u mnogobrojne stanične procese.

Upravo stoga što je GSH prisutan u svim stanicama te je mjera antioksidacijske zaštite stanice važno je razviti pouzdanu i reproducibilnu metodu za njegovo praćenje u biološkim uzorcima. Pored toga istraživanja pokazuju da pohranjivanje uzoraka (njihovo stajanje na sobnoj temperaturi i zamrzavanje uzoraka) može utjecati na izmjerenu koncentraciju GSH. Primijećeno je da zbog enzimatskog djelovanja i autooksidacije u uzorcima koji stoje koncentracija GSH se snižava. S druge strane razlike u izmjerenoj koncentraciji GSH u biološkim uzorcima pohranjenima na -20°C i -80°C nije bilo (Lin i sur., 2006).

Svrha ovog diplomskog rada bila je optimizirati metodu mjerenja GSH u plazmi te ispitati stabilnost GSH u biološkim uzorcima. U prvome dijelu istraživanja pomoću kontrolnog uzorka plazme ispitani su optimalni uvjeti mjerenja GSH kako bi se utvrdila pouzdana metoda za praćenje koncentracije GSH u uzorcima plazme. U drugome dijelu proveden je biološki pokus, odnosno pribavljen je uzorak krvi koji je alikvotiran u više epruveta koje su pohranjene ili u kontroliranim uvjetima (pri 37 °C u vlažnoj atmosferi s 5 % CO₂) ili u zamrzivaču (na -20 °C) te je praćena stabilnost GSH. Rezultati drugog dijela istraživanja trebali bi pokazati utjecaj pohranjivanja na koncentraciju GSH u uzorcima plazme i krvi i olakšati istraživačima planiranje pokusa.

3. Materijali i metode

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

U ovom su istraživanju korištene kemikalije:

5,5'-ditiol-(2-nitrobenzojeva kiselina), DTNB (Sigma, St. Louis, USA); natrijev hidrogenfosfat dodekahidrat, kristalni, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$ (Kemika, Hrvatska); natrijev dihidrogenfosfat, kristalni NaH_2PO_4 , (Kemika, Hrvatska); klorovodična kiselina, HCl (Kemika, Hrvatska).

Sve korištene kemikalije bile su *pro analysi* čistoće. Za pripremu otopina korištena je destilirana voda.

3.1.2. Oprema

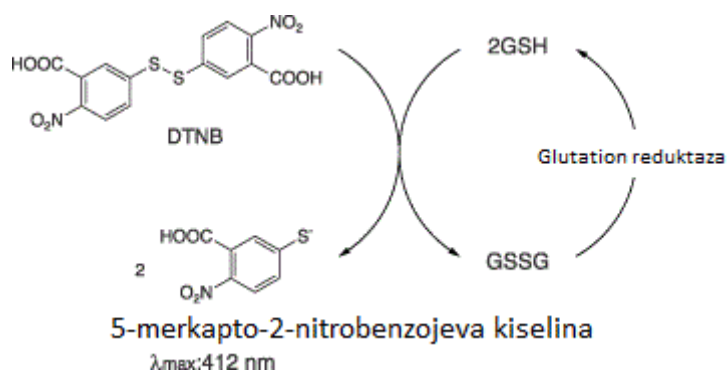
U ovom istraživanju korištena je oprema:

- Analitička vaga Pb303 Delta Range (Mettler Toledo, Švicarska);
- Centrifuga Frontier 5706 (Ohaus, Greifensee, Švicarska);
- Centrifuga Heraeus Biofuge Pico (Heraeus Instruments, DJB Labcare Ltd., UK);
- Miješalica/vortex (Heidolph, Njemačka);
- pH metar Hanna HI 9025 (Hanna instruments, Portugal);
- Kvarcna kiveta volumena 1,4 ml (Yixing Zhcheng Material, China);
- UV-Vis spektrofotometar T70 (PG Instruments, UK);
- Heparinizirani spremnici (Becton Dickinson, USA);
- Inkubator za održavanje kontroliranih uvjeta od 37°C i vlažne atmosfere s 5 % CO_2 (Heraeus Hera Cell 240 inkubator, Langenselbold, Njemačka).

3.2. Metode

3.2.1. Princip metode određivanja GSH

Spektrofotometrijska metoda određivanja GSH bazira se na reakciji oksidacije GSH-a od strane sulfhidrilnog reagensa 5,5'-ditiol-(2-nitrobenzojeva kiselina) ili skraćeno DTNB koja daje žuti produkt 5'-tio-2-nitrobenzojeva kiselina ili skraćeno TNB (Rahman i sur., 2006). Smatra se da je nastali produkt stabilan, a intenzitet žute boje nastalog produkta može se očitati pomoću UV-Vis spektrofotometra pri valnoj duljini od 412 nm. Reakcija DTNB-a sa sulfhidrilnom (tiolnom) skupinom GSH prikazana je na Slici 6. Koncentraciju GSH u uzorku moguće je izračunati prema Beer-Lambertovom zakonu i poznatom apsorpcijskom koeficijentu, $\epsilon = 14,15 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Eyer i sur., 2003).

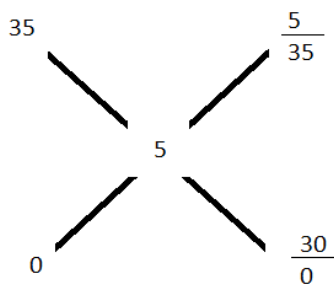


Slika 6. Reakcija sulfhidrile (tiolne) skupine GSH s 5,5'-ditiol-(2-nitrobenzojevom kiselinom), DTNB-om (preuzeto od: Shaik i Mehvar, 2006).

3.2.2. Priprema otopina

Priprema 5 % otopine klorovodične kiseline

5 % klorovodična kiselina pripremljena je razrjeđivanjem koncentrirane klorovodične kiseline s destiliranom vodom. Izračun je napravljen metodom zvijezde:



Za pripremu 35 mL 5 % klorovodične kiseline uzeto je 5 mL 35 % klorovodične kiseline i 30 mL destilirane vode. 5 % klorovodična kiselina se koristila za taloženje proteina iz biološkog uzorka (krv).

Priprema 0,3 M natrijevog fosfatnog pufera pH 7,4

Za pripremu 0,3 M natrijevog fosfatnog pufera prethodno je potrebno pripremiti 0,3 M Na_2HPO_4 i 0,3 M NaH_2PO_4 te ih pomiješati kako bi pH otopine bio 7,4.

Za pripremu 0,3 M Na_2HPO_4 odvagano je 107,44 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$ i kvantitativno preneseno u odmjernu tikvicu od 1 L te nadopunjeno s destiliranom vodom.

Za pripremu 0,3 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ odvagano je na analitičkoj vagi 46,8 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, kvantitativno preneseno u odmjernu tikvicu od 1 L i nadopunjeno s destiliranom vodom.

Pripremljene otopine su se pomiješale, a pomoću pH metra se pratio pH kako bi dobiveni natrijev fosfatni pufer imao pH 7,4.

Priprema otopine 1 mM DTNB-a

10 mM DTNB je pripremljen tako da je na analitičkoj vagi odvagano 0,0396 g DTNB-a. Odvaga je kvantitativno prenesena u odmjernu tikvicu od 10 mL i nadopunjena s destiliranom vodom. 1 mM otopina DTNB-a pripremila se razrjeđivanjem 10 puta otopine 10 mM DTNB-a. Potrebnu otopinu (1 mM DTNB) preciznije je pripremiti razrjeđivanjem 10 mM otopine DTNB-a nego vaganjem 0,00396 g DTNB-a.

3.2.3. Postupak pripreme uzorka plazme i krvi za određivanja koncentracije GSH

Plazma

Plazma je centrifugirana (5600 rpm, 5 min) kako bi se odvojio supernatant. Potom je u 100 μL supernatanta dodano 850 μL natrijevog fosfatnog pufera (0,3 M, pH 7,4) i 50 μL DTNB-a (1 mM). Intenzitet nastalog obojenja izmjeren je spektrofotometrijski pomoću UV-Vis spektrofotometra pri 412 nm i sobnoj temperaturi. Uz uzorke plazme pripremljen je i uzorak destilirane vode koji je korišten kao slijepa proba.

Uzorci za spektrofotometrijsko određivanje GSH u plazmi pripremani su prema shemi prikazanoj Tablicom 2.

Tablica 2. Shematski prikaz pripreme uzoraka plazme za određivanje koncentracije GSH.

	Slijepa proba	Uzorak
De- H_2O (μL)	100	-
Supernatant plazme (μL)	-	100
Natrijev fosfatni pufer (μL)	850	850
DTNB (μL)	50	50

Koncentracija GSH u uzorku je izračunata pomoću Beer-Lambertovog zakona na osnovu očitane apsorbancije uzorka i poznatog apsorbancijskog koeficijenta.

Puna krv

Uzorci krvi prethodno su tretirani s 5 % klorovodičnom kiselinom te centrifugirani (5600 rpm, 15 min) kako bi se uklonile interferencije. Potom je u 500 µL supernatanta dodano 350 µl natrijevog fosfatnog pufera (0,3 M, pH 7,4) i 50 µl DTNB-a (1 mM), a intenzitet obojenja je izmjeren na UV-Vis spektrofotometru pri 412 nm i sobnoj temperaturi. Uz uzorke je pripreman i uzorak destilirane vode koji je služio kao slijepa proba.

Koncentracija GSH u uzorku supernatanta krvi izračunata je pomoću Beer-Lambertovog zakona na osnovu očitane apsorbancije uzorka i poznatog apsorbancijskog koeficijenta.

3.3. Biološki pokus za utvrđivanje stabilnosti GSH u uzorku plazme i krvi

Kako bi se utvrdila stabilnost GSH u biološkom uzorku (plazma i krv) pripremljeno je više uzoraka plazme i krvi, pohranjeno ili na 24 sata u inkubatoru na 37 °C u vlažnim uvjetima uz 5 % CO₂ ili u zamrzivaču na -20 °C, a potom je u njima izmjerena koncentracija GSH.

Za potrebe praćenja stabilnosti GSH, krv je prikupljena u sterilnim uvjetima u spremnik koji sadrži heparin kao antikoagulans. Krv je donirala ženska osoba starosti 29 godina, a koja prethodno nije bila izložena zračenju i lijekovima koji bi mogli imati utjecaja na koncentraciju GSH u plazmi ili krvi. Donor krvi je dobrovoljno sudjelovao u istraživanju te je bio upoznat sa svrhom istraživanja kao i s mogućnošću bezrazložnog odustajanja od istraživanja u bilo kojem trenutku, u skladu s dopusnicom Etičkog povjerenstva.

Plazma

Nakon prikupljanja krvi, krv je centrifugirana (5000 rpm, 5 min) kako bi se odvojila plazma. Plazma je pospremljena u 4 odvojene Eppendorf epruvete. Odmah nakon centrifugiranja koncentracija GSH je određena samo u plazmi koja je pospremljena u prvoj epruveti (epruveta 1) kako bi se utvrdila početna koncentracija GSH u plazmi bez utjecaja inkubacije (37 °C) ili zamrzavanja (-20 °C).

Kako bi se utvrdio utjecaj inkubacije na koncentraciju GSH u plazmi uzorci krvi u epruvetama 2, 3 i 4 pohranjeni su u inkubator (na 37 °C u vlažnoj atmosferi s 5% CO₂) u vremenu od 24 sata, nakon čega je krv u epruveti 2 centrifugirana (5000 rpm, 5 min) te je

odvojena plazma u kojoj je određena koncentracija GSH. Nakon inkubacije od 24 sata (na 37 °C u vlažnoj atmosferi s 5% CO₂), uzorci krvi u epruvetama 3 i 4 su centrifugirani i odvojena je plazma. Uzorci plazme (epruvete 3 i 4) pohranjeni su u zamrzivaču na -20 °C te je u njima određena koncentracija GSH nakon 8 odnosno 30 dana nakon pohranjivanja na -20 °C kako bi se utvrdio utjecaj zamrzavanja uzorka na koncentraciju GSH u plazmi.

Puna krv

Nakon prikupljanja krvi, krv je pospremljena u 4 odvojene Eppendorf epruvete. U prvoj epruveti (epruveta 1) izmjerena je koncentracija GSH odmah nakon vađenja krvi, a kako bi se utvrdila početna koncentracija GSH u krvi.

Utjecaj inkubacije na 37 °C u vlažnoj atmosferi s 5% CO₂ u periodu od 24 sata na koncentraciju GSH u krvi određen je tako da su uzorci krvi u epruvetama 2, 3 i 4 pohranjeni u inkubatoru na 37 °C i vlažnoj atmosferi s 5% CO₂ na 24 sata, nakon čega je izmjerena koncentracija GSH u krvi u epruveti 2.

Nakon inkubacije od 24 sata (na 37 °C u vlažnoj atmosferi s 5% CO₂), uzorci krvi u epruvetama 3 i 4 su pohranjeni u zamrzivaču na -20 °C te je u njima određena koncentracija GSH nakon 8 odnosno 30 dana nakon pohranjivanja na -20 °C kako bi se utvrdio utjecaj zamrzavanja na koncentraciju GSH u krvi.

3.4. Statistička obrada rezultata

Dobiveni rezultati prikazani su kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Razlika u koncentraciji GSH između grupa testirana je upotrebom t-testa u programu Excel. Razina značajnosti od $p < 0,05$ uzeta je kao statistički značajna razlika.

4. Rezultati i rasprava

GSH je dugo vremena bio poznat kao obrambeni mehanizam protiv toksičnih ksenobiotika. Novije spoznaje pokazuju da GSH ima direktnu i indirektnu zaštitnu ulogu u oksidacijskom stresu. Daljnja istraživanja su pokazala da o koncentraciji GSH u stanici ovisi hoće li slobodni radikali biti adekvatno uklanjani. Ukoliko je koncentracija GSH preniska, višak slobodnih radikala će ostati u stanici i tako će doći do oksidacijskog stresa. Ukoliko je pak koncentracija GSH prevelika to može biti promotor oksidacijskog stresa uslijed reagiranja s metalnim ionima nakon čega nastaju slobodni radikali (Pompella i sur., 2003).

S obzirom na važnost GSH u oksidacijsko-redukcijskoj ravnoteži, cilj ovoga istraživanja bio je optimizirati metodu mjerenja koncentracije GSH u plazmi te ispitati stabilnost GSH u plazmi i krvi.

4.1. Optimiziranje metode mjerenja GSH u plazmi

Metoda koja se najčešće koristi za određivanje koncentracije GSH u biološkim uzorcima je metoda u kojoj DTNB reagira s tiolnom skupinom GSH. DTNB se pokazao kao dovoljno osjetljiv za detekciju koncentracije GSH u biološkim uzorcima. No, problem je što DTNB reagira sa svim alifatskim tiolima u uzorcima, a ne samo s tiolnom skupinom GSH (Habeeb, 1972). Stoga metoda nije selektivna. S obzirom da je metodu razvio George Ellman, metoda se zove i Ellmanova, a DTNB reagens Ellmanov reagens. Sama reakcija je brza te 1 M tiola u reakciji s DTNB-om daje 1 mol produkta TNB-a koji je žute boje i pokazuje maksimum apsorpcije na 412 nm (Ellman, 1959).

U ovom istraživanju ispitan je postupak pripreme plazme prema kojem se u 100 μ L plazme dodaje 850 μ L natrijevog fosfatnog pufera (određene molarnosti i pH) i 50 μ L DTNB-a (koncentracije 1 mM). Uloga fosfatnog pufera u reakcijskoj smjesi je održavanje konstantnih uvjeta pH koji su potrebni za reakciju između DTNB-a i tiolne skupine GSH, odnosno pufer sprječava inhibiciju željene reakcije i pojave neželjenih reakcija u reakcijskoj smjesi.

Kako metoda određivanja koncentracije GSH pomoću Ellmanovog reagensa nije selektivna, odnosno DTNB osim s tiolnom skupinom GSH reagira i s tiolnim skupinama proteina koji se nalaze u reakcijskoj smjesi potrebno je ukloniti proteine iz uzorka kao moguće interferencije iz uzorka, a koje bi mogle pokazati lažno povišenu koncentraciju GSH. U svrhu uklanjanja interferencija uzorci plazme prije reakcije s DTNB-om su centrifugirani.

Tablica 3. Rezultati ispitivanja utjecaja centrifugiranja na uzorke plazme prilikom određivanja GSH.

Postupak	Očitana apsorbanca na 412 nm	Koncentracija GSH (μM)
Plazma nije centrifugirana	0,500 – 0,600	35,3 – 42,4
Plazma je centrifugirana	0,240	17,0

Rezultati prikazani Tablicom 3 pokazuju da su centrifugiranjem plazme uklonjene interferencije koje bi mogle rezultirati lažno povišenim rezultatom koncentracije GSH. Stoga se može zaključiti da su optimalni uvjeti za pripremu uzoraka plazme za određivanje koncentracije GSH prethodno centrifugiranje uzorka plazme te postupak u kojem 100 μL supernatanta plazme reagira s 50 μL DTNB-a (1 mM) u prisutnosti 850 μL natrijevog fosfatnog pufera (0,3 M, pH 7,4), a apsorbanca tako pripremljenog uzorka se mjeri pri 412 nm na sobnoj temperaturi.

Krv se sastoji od plazme i krvnih stanica te je u uzorcima krvi osim GSH iz plazme prisutan GSH iz krvnih stanica. Stoga je potrebno optimizirati pripremu uzorka krvi kako bi došlo do pucanja staničnih membrana, a u uzorku bio prisutan sav GSH, i onaj iz plazme i onaj iz krvnih stanica. Pored toga potrebno je istaložiti proteine od kojih neki mogu imati tiolne skupine i tako interferirati u reakciji i pokazati lažno povišenu koncentraciju GSH. U ovom istraživanju su stoga uzorci krvi tretirani s 5 % klorovodičnom kiselinom.

Ispitani su različiti postupci pripreme krvi kako bi se uklonile interferencije i izmjerila koncentracija ukupnog GSH u krvi (Tablica 4). Pokazano je da kada je omjer krvi i kiseline 1:2, odnosno kada se 800 μL krvi tretira s 1600 μL 5 % klorovodične kiseline moguće je izmjeriti optimalnu vrijednost apsorbance pomoću UV-Vis spektrofotometra. U postupak se dalje uzima 500 μL supernatanta krvi tretirane s 5 % klorovodične kiseline te dodaje 50 μL DTNB-a (koncentracije 1 mM) i 350 μL natrijevog fosfatnog pufera (0,3 M i pH 7,4), a apsorbancija se očitava na UV-Vis spektrofotometru pri 412 nm i sobnoj temperaturi.

Tablica 4. Ispitivanje različitih postupaka pripreme uzorka krvi za određivanje koncentracije GSH.

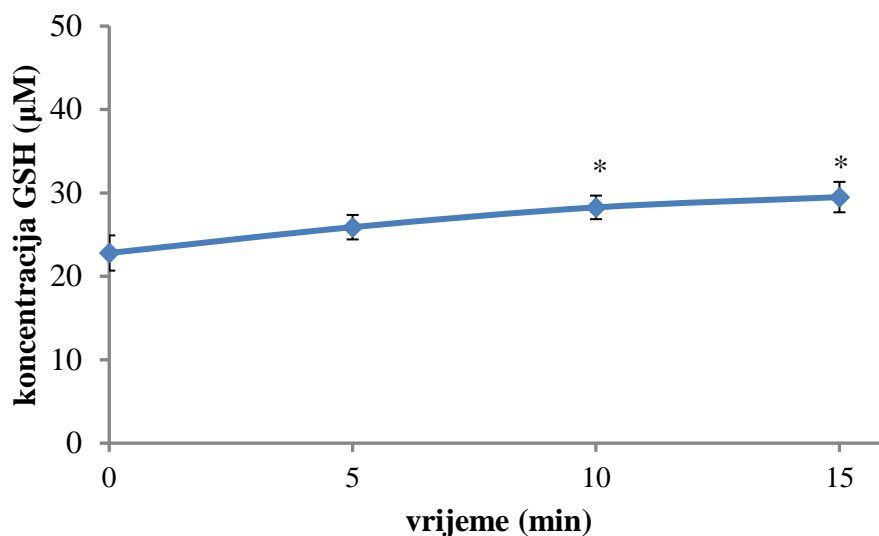
Postupak pripreme uzorka krvi	Očitana apsorbanca na 412 nm	Koncentracija GSH (μM)
800 μl pune krvi + 800 μl 5 % HCl, centrifugiranje 5600 rpm, 15 min	1,100	77,7
800 μl pune krvi + 1600 μl 5% HCl, centrifugiranje 5600 rpm, 15 min	0,4156	29,4
800 μl pune krvi + 1600 μl 10 % HCl, centrifugiranje, 5600 rpm, 15 min	0,030	2,1

4.2. Stabilnost produkta TNB

S obzirom da je u literaturi navedeno da produkt koji nastaje reakcijom GSH-DTNB, TNB stabilan svega 10 minuta ispitana je stabilnost produkta (Landino i sur., 2008). Uzorak plazme pripremljen je kako je prethodno opisano te je koncentracija produkta reakcije GSH-DTNB, odnosno koncentracija TNB izmjerena odmah, nakon 5, 10 i 15 minuta stajanja. Dobiveni rezultati prikazani su Tablicom 5 i Slikom 7.

Tablica 5. Ispitivanje stabilnosti produkta GSH-DTNB u razdoblju od 0 do 15 minuta.

	Koncentracija GSH (μM)			
	0 min	5 min	10 min	15 min
Uzorak 1	19,8	24,1	26,6	27,5
uzorak 2	23,0	26,3	28,9	31,1
uzorak 3	23,6	25,6	27,8	29,9
uzorak 4	24,8	27,6	29,8	
Srednja vrijednost \pm SD	22,8 \pm 2,1	25,9 \pm 1,5	28,3 \pm 1,4*	29,5 \pm 1,8*



Slika 7. Stabilnost produkta TNB praćena u razdoblju od 15 minuta.

Prilikom praćenja koncentracije produkta TNB primijećen je porast njegove koncentracije, a statistička razlika je primijećena nakon 10 minuta (t-test, $p < 0,05$). Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da je produkt reakcije GSH-DTNB, TNB stabilan svega 5 minuta te da se nakon dodavanja reagensa (DTNB-a) koncentracija novonastalog produkta može pouzdano izmjeriti unutar 5 minuta. No, s obzirom na primijećen znaćajan porast apsorbancije nakon 10 min, inkubacija duća od 5 minuta nije preporučljiva.

4.3. Ispitivanje stabilnosti GSH u uzorcima plazme i krvi u ovisnosti o pohranjivanju

Prema literaturnim podacima GSH je stabilan u eritrocitima venske krvi uz dodatak antikoagulansa. Na temperaturi od 4 °C GSH je stabilan i do tri tjedna. Ipak, pokazano je da u otopini GSH polako oksidira (Habeeb, 1972). S obzirom na moguću autooksidaciju GSH u uzorku u ovom istraživanju ispitana je stabilnost GSH u uzorcima plazme i krvi.

Stabilnost GSH u plazmi i krv praćena je u uzorcima plazme i krvi prije i nakon pohranjivanja u inkubatoru na 37 °C u vlaćnoj atmosferi s 5 % CO₂ nakon 24 sata. Za ovo ispitivanje isti uzorak plazme i krvi razdijeljen je u 4 epruvete. U prvom uzorku plazme i krvi izmjerena je koncentracija GSH odmah i ta je koncentracija predstavljala početnu vrijednost GSH. Preostali uzorci plazme i krvi stavljeni su u inkubator (37 °C, vlaćna atmosfera s 5% CO₂ na 24 sata) te im je izmjerena koncentracija GSH nakon inkubacije. Rezultati su prikazani Tablicama 6 i 7. 24 satna inkubacija plazme na 37 °C u vlaćnoj atmosferi s 5 % CO₂ dovela je do porasta koncentracije GSH, a taj porast bio je statistički znaćajan u odnosu na početnu

vrijednost GSH (nakon 24 sata inkubacije: $23,3 \pm 2,1 \mu\text{M}$; početna vrijednost: $18,5 \pm 1,5 \mu\text{M}$; t-test, $p < 0,05$).

Tablica 6. Stabilnost GSH u plazmi nakon inkubacije na 37°C u vlažnoj atmosferi s 5 % CO_2 u periodu od 24 sata.

	Koncentracija GSH (μM)	
	0 h na 37°C	24 h na 37°C
uzorak 1	16,7	21,4
uzorak 2	18,1	22,6
uzorak 3	19,2	23,0
uzorak 4	20,0	26,3
Srednja vrijednost \pm SD	$18,5 \pm 1,5$	$23,3 \pm 2,1^*$

* statistički različito ($p < 0,05$)

Rezultati ispitivanja utjecaja inkubacije na koncentraciju GSH u uzorcima krvi potvrdili su te rezultate (Tablica 7). Nakon 24 satne inkubacije na 37°C u vlažnim uvjetima s 5 % CO_2 i u uzorcima krvi došlo je do porasta koncentracije GSH koja je bila statistički značajna (t-test, $p < 0,05$). Koncentracija GSH u uzorcima krvi prije inkubacije je bila $119,8 \pm 2,0 \mu\text{M}$, a nakon inkubacije $123,6 \pm 2,2 \mu\text{M}$.

Tablica 7. Stabilnost GSH u punoj krvi nakon inkubacije na 37°C u vlažnim uvjetima s 5 % CO_2 u periodu od 24 sata.

	Koncentracija GSH (μM)	
	0 h na 37°C	24 h na 37°C
uzorak 1	117,5	121,1
uzorak 2	121,3	125,0
uzorak 3	120,7	124,7
Srednja vrijednost \pm SD	$119,8 \pm 2,0$	$123,6 \pm 2,2^*$

* statistički značajno različito ($p < 0,05$)

Dobiveni rezultati također pokazuju da je koncentracija GSH u krvi otprilike 6 puta veća nego koncentracija GSH u plazmi što je i za očekivati s obzirom da se u krvi osim plazme nalaze i krvne stanice koje sadrže GSH.

U slijedećem koraku ispitivan je utjecaj pohranjivanja, odnosno zamrzavanja uzoraka plazme na -20 °C na stabilnost GSH. Rezultati su prikazani Tablicom 8. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da je GSH iz uzoraka plazmi pohranjenih na -20°C stabilan do 30 dana.

Tablica 8. Stabilnost GSH u plazmi tijekom pohranjivanja na -20 °C u periodu od 30 dana.

	Koncentracija GSH (μM)		
	1. dan	8. dan	30. dan
uzorak 1	21,4	19,8	21,7
uzorak 2	22,6	23,0	23,6
uzorak 3	23,0	23,6	19,8
uzorak 4	26,3	24,8	24,4
Srednja vrijednost ± SD	23,3 ± 2,1	22,8 ± 2,1	22,4 ± 2,1

Također, ispitana je stabilnost GSH u krvi pohranjene u zamrzivaču na -20 °C nakon 8 i 30 dana. Rezultati su prikazani Tablicom 9. Također ni u uzorcima krvi pohranjenim u zamrzivaču na -20 °C u periodu od 30 dana nije došlo do značajnije promijene koncentracije GSH.

Tablica 9. Stabilnost GSH u punoj krvi tijekom pohranjivanja na -20 °C u periodu od 30 dana.

	Koncentracija GSH (μM)		
	1. dan	8. dan	30. dan
uzorak 1	121,1	125,4	127,3
uzorak 2	125,0	127,2	130,1
uzorak 3	124,7	122,5	126,4
Srednja vrijednost ± SD	123,6 ± 2,2	125,3 ± 2,4	127,9 ± 1,9

5. Zaključci

- Centrifugiranjem plazme uklanjaju su molekule s tiolnim skupinama koje bi mogle reagirati s DTNB reagensom pri određivanju GSH te je stoga prilikom spektrofotometrijskog određivanja koncentracije GSH preporučljivo centrifugirati uzorke plazme.
- Produkt GSH i DTNB-a, TNB je stabilan tijekom 5 minuta te je stoga nužno provesti mjerenje u tom periodu.
- Razine GSH u plazmi i punoj krvi porasle su tijekom inkubacije na 37°C u vlažnoj atmosferi s 5% CO₂ tijekom 24 sata te se može zaključiti da je prilikom takvog pohranjivanja došlo do sinteze GSH s obzirom da se radi uvjetima koji su slični fiziološkim.
- Pohranjivanje uzoraka plazme i pune krvi na -20°C u periodu od 30 dana nije utjecalo na izmjerenu razinu GSH u plazmi i krvi te je stoga moguće sigurno pohraniti uzorke prije mjerenja GSH u zamrzivaču na -20 °C do 30 dana.

6. Literatura

1. Adly AAM. Oxidative stress and disease: An updated review. *Res J Immunol*, 2010, 3, 129-145.
2. Berg RH, Preuss ML, Cameron JC, Jez JM. Immunolocalization of glutathione biosynthesis enzymes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol Biochem*, 2014, 75, 9-13.
3. Čepelak I. Slobodni radikali i antioksidansi. U: Štrausova medicinska biokemija. Čvorišćec D, Čepelak I, urednice, Zagreb, Medicinska naklada, 2009, str. 638-648.
4. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys*, 1959, 82, 70-77.
5. Eyer P, Worek F, Kiderlen D, Sinko G, Stuglin A, Simeon-Rudolf V, Reiner E. Molar absorption coefficients for the reduced Ellman reagent: reassessment. *Anal Biochem*, 2003, 312, 224-227.
6. Fleury C, Mignotte B, Vayssière JL. Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. *Biochim*, 2002, 84, 131-141.
7. Gerić M, Domijan A-M, Gluščić V, Janušić R, Šarčević B, Garaj-Vrhovac V. Cytogenetic status and oxidative stress parameters in patients with thyroid diseases. *Mut Res*, 2016, 810, 22-29.
8. Gohain N. Studies on the structure and function of phenazine modifying enzymes PhzM and PhzS involved in the biosynthesis of pyocyanin. Doktorska disertacija, Dortmund, Sveučilište u Dortmundu, 2008.
9. Habeeb A. Reaction of protein sulfhydryl groups with Ellmans reagent. *Meth Enzymol*, 1972, 25, 457-464.
10. Halliwell B, Cross CE. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environ Health Perspect*, 1994, 102 (Suppl 10), 5-12.
11. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radical biology and medicine. London, Oxford Univ. Press, 2007.

12. Jurković S, Osredkar J, Marc J. Molekularni utjecat glutation-peroksidaza u antioksidacijskim procesima. *Biochem Med*, 2008, 18, 162-174.
13. Landino LM, Mall CB, Nicklay JJ, Dutcher SK, Moynihan KL. Oxidation of 5-thio-2-nitrobenzoic acid, by the biologically relevant oxidants peroxynitrite anion, hydrogen peroxide and hypochlorous acid. *Nitric Oxide*, 2008, 18, 11-18.
14. Li X, Fang P, Mai J, Choi ET, Wang H, Yang X-F. Targeting mitochondrial reactive oxygen species as novel therapy for inflammatory diseases and cancers. *J Hem Oncol*, 2013, 6, 19.
15. Lin S-K, Tsai S-M, Huang J-C, Lee S-C, Wu S-H, Ma H, Lin J-T, Tsai L-Y., Effects of storage time and temperature on the stability of glutathione in deproteinized blood sample. *J Food Drug Anal*, 2006, 14, 141–146.
16. Milevoj Kopčinović L, Domijan A-M, Posavac K, Čepelak I, Žanić Grubišić T, Rumora L., Systemic redox imbalance in stabile chronic obstructive pulmonary disease. *Biomarkers*, 2016, 21, 692-698.
17. Monokromator, god, <http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=41722>, pristupljeno 15.2.2019.
18. Nigović B, Jurišić Grubešić R, Vuković J. Praktikum iz analitike lijekova I.dio, Ultraljubičasta i vidljiva apsorpcijska sprektofotometrija. Zagreb, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2007, str. 34-38.
19. Noctor G, Gomez L, Vanacker H, Foyer CH. Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signalling. *J Exp Bot*, 2002, 53, 1283–1304.
20. Patel SG, Sekhar RV, McKay SV, Guthikonda AP, Reddy VT, Balasubramanyam A, Jahoor F. Glutathione synthesis is diminished in patients with uncontrolled diabetes and restored by dietary supplementation with cysteine and glycine. *Diab Care*, 2014, 34, 162-167.

21. Pompella A, Visviks A, Paolicchi A, De Tata V, Casini AF. The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochem Pharmacol*, 2003, 66, 1499-1503.
22. Rahman I, Kode A, Biswas SK. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nat Protoc*, 2006, 1, 3159-3165.
23. Reuben C. Opasni slobodni radikali. U: Antioksidansi. Zagreb, Izvori, 1998, str. 20-30.
24. Rogulj D, Konjevoda P, Milić M, Mladinić M, Domijan A-M. Fatty liver index as an indicator of metabolic syndrome. *Clin Biochemistry*, 2012, 45, 68-71
25. Shaik IH, Mehvar R. Rapid determination of reduced and oxidized glutathione levels using a new thiol-masking reagent and the enzymatic recycling method: Application to the rat liver and bile samples. *Anal Bioanal Chem*, 2006, 385, 105–113.
26. Smith AR, Shenvi SV, Widlansky M, Suh JH, Hagen TM. Lipoic acid as a potential therapy for chronic diseases associated with oxidative stress. *Curr Med Chem*, 2004, 11, 1135-1146.
27. Watson D. Pharmaceutical analysis. Edinburgh, Churchill Livingstone, 1990.

7. Sažetak/Summary

Sažetak

Reducirani glutation (GSH) tripeptid je cisteina, glutaminske kiseline i glicina te predstavlja najvažniji neenzimatski antioksidans u organizmu. Cilj ovoga istraživanja bio je optimizirati metodu mjerenja GSH u ljudskoj krvi i plazmi te ispitati stabilnost GSH prilikom pohranjivanja uzoraka. Uzorci krvi i plazme pribavljeni su od dobrovoljnog davatelja krvi. Ispitivanje stabilnosti GSH provedeno je tako da je jedan uzorak podijeljen u četiri epruvete. U prvom uzorku plazme ili krvi koncentracija GSH izmjerena je odmah. Dio je uzoraka pohranjen u inkubatoru (na 37 °C u vlažnoj atmosferi s 5% CO₂), a preostala po dva uzorka nakon sakupljanja pospremljeni su u zamrzivač na -20 °C kroz 8 i 30 dana. Koncentracija GSH izmjerena je pomoću Ellmanovog reagensa (5,5'-ditiol-(2-nitrobenzojeva kiselina), DTNB, spektrofotometrijski pri valnoj duljini $\lambda = 412$ nm i sobnoj temperaturi. Reakcija tiolne skupine GSH s DTNB-om odvija se na sobnoj temperaturi i pH = 7,4 pri čemu nastaje žuti produkt 5'-tio-2-nitrobenzojeva kiselina (TNB). Mjerenja su provedena na UV-Vis spektrofotometru, a koncentracija GSH određena je pomoću molarog apsorpcijskog koeficijenta (ϵ) koji iznosi $14,15 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Ispitivanja su pokazala da je centrifugiranje plazme, prije spektrofotometrijskog određivanja GSH optimalno kako bi se uklonio dio interferencija koje bi mogle reagirati sa DTNB reagensom i odredila točna koncentracija GSH. Za određivanje koncentracije GSH u krvi potrebno je krv tretirati s 5 % klorovodičnom kiselinom kako bi se uklonile interferencije i omogućilo određivanje GSH. Nakon pohranjivanja uzorka krvi na 37 °C u vlažnoj atmosferi tijekom 24 sata uočen je statistički značajan porast koncentracije GSH i u plazmi i u krvi te se može zaključiti da su ovi uvjeti potakli sintezu GSH u krvnim stanicama. U uzorcima plazme i krvi pohranjenima na -20°C tijekom 8 i 30 dana nisu uočene statistički značajne razlike u koncentraciji GSH. Stoga se može zaključiti da prilikom pohranjivanja uzoraka plazme i krvi na -20 °C do 30 dana ne dolazi do razgradnje GSH.

Summary

Reduced glutathione (GSH) is cysteine, glutamic acid and glycine tripeptide. It is the most important non-enzymatic antioxidant in the body. The aim of this study was to optimize the GSH measurement method in human blood and plasma samples, and to investigate GSH stability when storing samples. Blood and plasma samples were obtained from volunteer blood donor. To test GSH stability blood or plasma sample was divided into four tubes. In the first sample, concentration of GSH was measured immediately. Part of the samples were stored in the incubator (at 37 ° C in a humid atmosphere with 5% CO₂) and the remaining samples were frozen at -20 ° C and kept for 8 or 30 days. GSH concentration was measured using an Ellman reagent (5,5'-dithiobis- (2-nitrobenzoic acid), DTNB spectrophotometrically at wavelength $\lambda = 412$ nm on room temperature. The reaction of thiol group GSH with DTNB was carried out at room temperature and pH 7.4, resulting in a yellow product of 5'-thio-2-nitrobenzoic acid (TNB). The measurements were performed on UV-Vis spectrophotometer and the GSH concentration was determined by a molar absorption coefficient (ϵ) which is $14.15 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Tests have shown that centrifugation of plasma prior to spectrophotometric determination of GSH is optimal in order to remove interfering molecules and to determine the actual GSH concentration. Blood sample needs to be treated with 5% chlorodhydrogen acid, to remove possible interfering molecules with the reagents, and to reliably measure GSH. Storing plasma and blood sample at 37 ° C and the humid atmosphere after 24 hours showed statistically significant increase in GSH level in blood and plasma, probably due to GSH synthesis in blood cells. Storing blood and plasma samples at -20 ° C for 8 or 30 days did not affect the level of the GSH. Therefore can be concluded that during storage of plasma and blood samples at -20 °C for 30 days GSH was not degraded.

8. Prilog

Popis kratica

ADP – adenin difosfat

ATP – adenin trifosfat

DNA – deoksiribonukleinska kiselina

DTNB – Ellmanov reagens, 5,5`-ditiobis-(2-nitrobenzojeva kiselina)

GSH – reducirani glutathion

GSSG – oksidirani glutathion

H₂O – voda

H₂O₂ – vodikov peroksid

NADH – Nikotin amid dinukleotid reduktaza

NADP – nikotinamid dinukleotid fosfat

NADPH – nikotinamid dinukleotid hidrogenfosfat

ROS – reactive oxygen species, slobodni kisikovi radikali

UCP – mitochondrial uncoupling proteins, slobodni mitohondrijski protein

9. Temeljna dokumentacijska kartica/Basic documentation card

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za farmaceutsku botaniku
Scrotova 39, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

ISPITIVANJE STABILNOSTI GLUTATION U UZORCIMA PLAZME I KRV

Vesna Vujeva

SAŽETAK

Reducirani glutation (GSH) tripeptid je cisteina, glutaminske kiseline i glicina te predstavlja najvažniji neenzimatski antioksidans u organizmu. Cilj ovoga istraživanja bio je optimizirati metodu mjerenja GSH u ljudskoj krvi i plazmi te ispitati stabilnost GSH prilikom pohranjivanja uzoraka. Uzorci krvi i plazme pribavljeni su od dobrovoljnog davatelja krvi. Ispitivanje stabilnosti GSH provedeno je tako da je jedan uzorak podijeljen u četiri epruvete. U prvom uzorku plazme ili krvi koncentracija GSH izmjerena je odmah. Dio je uzoraka pohranjen u inkubatoru (na 37 °C u vlažnoj atmosferi s 5% CO₂), a preostala po dva uzorka nakon sakupljanja pospremljeni su u zamrzivač na -20 °C na 8 i 30 dana. Koncentracija GSH izmjerena je pomoću Ellmanovog reagensa (5,5'-ditiol-(2-nitrobenzojeva kiselina), DTNB), spektrofotometrijski pri valnoj duljini $\lambda = 412 \text{ nm}$ i sobnoj temperaturi. Reakcija tiolne skupine GSH s DTNB-om odvija se na sobnoj temperaturi i pH = 7,4 pri čemu nastaje žuti produkt 5'-tio-2-nitrobenzojeva kiselina (TNB). Mjerenja su provedena na UV-Vis spektrofotometru, a koncentracija GSH određena je pomoću molarnog apsorpcijskog koeficijenta (ϵ) koji iznosi $14,15 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Ispitivanja su pokazala da je centrifugiranje plazme, prije spektrofotometrijskog određivanja GSH optimalno kako bi se uklonio dio interferencija koje bi mogle reagirati sa DTNB reagensom i odredila koncentracija GSH. Za određivanje koncentracije GSH u krvi potrebno je krv tretirati s 5 % klorovodičnom kiselinom kako bi se uklonile interferencije i omogućilo određivanje GSH. Nakon pohranjivanja uzorka krvi na 37 °C u vlažnoj atmosferi tijekom 24 sata uočen je statistički značajan porast koncentracije GSH i u plazmi i u krvi te se može zaključiti da su ovi uvjeti potakli sintezu GSH u krvnim stanicama. U uzorcima plazme i krvi pohranjenima -20°C tijekom 8 i 30 dana nisu uočene statistički značajne razlike u koncentraciji GSH. Stoga se može zaključiti da prilikom pohranjivanja uzoraka plazme i krvi na -20 °C do 30 dana ne dolazi do razgradnje GSH.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 35 stranica, 7 slika, 9 tablica, 27 citata. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: glutation, antioksidansi, oksidacijski stres, stabilnost GSH, DTNB, biološki uzorak

Mentori: **Dr. sc. Ana-Marija Domijan**, redoviti profesor, Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta

Dr. sc. Marko Gerić, znanstveni suradnik, Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada

Ocjenjivači: **Dr. sc. Ana-Marija Domijan**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta

Dr.sc. Marko Gerić, znanstveni suradnik, Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada

Dr.sc. Petra Turčić, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta

Rad prihvaćen: svibanj 2019.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Pharmaceutical Botany
Scrotova 39, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

TESTING OF GLUTATHION STABILITY IN SERUM AND PLASMA SAMPLES

Vesna Vujeva

SUMMARY

Reduced glutathione (GSH) is cysteine, glutamic acid and glycine tripeptide. It is the most important non-enzymatic antioxidant in the body. The aim of this study was to optimize the GSH measurement method in human blood and plasma samples, and to investigate GSH stability when storing samples. Blood and plasma samples were obtained from volunteer blood donor. To test GSH stability blood or plasma sample was divided into four tubes. In the first sample, concentration of GSH was measured immediately. Part of the samples were stored in the incubator (at 37 °C in a humid atmosphere with 5% CO₂) and the remaining samples were frozen at -20 °C and kept for 8 or 30 days. GSH concentration was measured using an Ellman reagent (5,5'-dithiobis- (2-nitrobenzoic acid), DTNB spectrophotometrically at wavelength $\lambda = 412$ nm on room temperature. The reaction of thiol group GSH with DTNB was carried out at room temperature and pH 7.4, resulting in a yellow product of 5'-thio-2-nitrobenzoic acid (TNB). The measurements were performed on UV-Vis spectrophotometer and the GSH concentration was determined by a molar absorption coefficient (ϵ) which is $14.15 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Tests have shown that centrifugation of plasma prior to spectrophotometric determination of GSH is optimal in order to remove interfering molecules and to determine the actual GSH concentration. Blood sample needs to be treated with 5% chlorodihydrogen acid, to remove possible interfering molecules with the reagents, and to reliably measure GSH. Storing plasma and blood sample at 37 °C and the humid atmosphere after 24 hours showed statistically significant increase in GSH level in blood and plasma, probably due to GSH synthesis in blood cells. Storing blood and plasma samples at -20 °C for 8 or 30 days did not affect the level of the GSH. Therefore can be concluded that during storage of plasma and blood samples at -20 °C for 30 days GSH was not degraded.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 35 pages, 7 pictures, 9 tables and 27 literature references. Original is in Croatian language.

Key words: glutathione, antioxidants, oxidative stress, GSH stability, DTNB, biological sample

Mentors: **Ana-Marija Domijan, Ph.D.** Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Marko Gerić, Ph.D. research assistant, Institute for Medical Research and Occupational Health, Zagreb

Reviewers: **Ana-Marija Domijan, Ph.D.** Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Marko Gerić, Ph.D. research assistant, Institute for Medical Research and Occupational Health, Zagreb
Petra Turčić, Ph.D. Professor Assistant, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Thesis accepted: May 2019.

